

산화스트레스를 유발한 위 상피세포에서 수치 치자의 세포 보호 효과

이종록^{1#}, 김상찬², 박숙자^{1*}

1 : 대구한의대학교 제약공학과, 2 : 대구한의대학교 한의과대학

Cytoprotective effect of the processed Gardeniae Fructus on oxidative stress-induced gastric epithelial cells

Jong Rok Lee^{1#}, Sang Chan Kim², Sook Jahr Park^{1*}

1 : Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

2 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objective : Gardeniae Fructus (GF) has bitter and cold nature. Thus, it has been traditionally prescribed in processed form roasted with ginger juice for patients with a weak stomach. This study investigated the effects of processed GF in tert-butyl hydroperoxide (tBHP)-treated gastric epithelial cells.

Methods : Processed GF was made by applying 40% ginger juice or 10% ethanol for 24 h and then roasting at 150°C for 5 minutes. Apoptosis was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. Mitochondrial membrane potential (MMP) was monitored by flow cytometry using the membrane permeable fluorescent dye Rh123. Protein expression was measured by Western blot analysis.

Results : Cell viability was reduced by tBHP and restored by ethanol extract of GF (GFE). In the TUNEL assay, it was found that cell death by tBHP was due to apoptosis, and GFE had an anti-apoptotic effect. Processed GF roasted with ginger juice showed the best anti-apoptotic effect. Processed GF also inhibited MMP loss and restored tBHP-induced changes in expression levels of apoptosis-related proteins. Increased ROS production and GSH depletion after tBHP treatment were significantly reduced by processed GF. In addition, tBHP-induced activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) was inhibited by processed GF.

Conclusion : These results demonstrate that the processed GF is able to protect gastric epithelial cells from oxidative stress-induced cell death with antiapoptotic and antioxidant activity. In addition, it shows that the processing of GF, which have been traditionally used for gastrointestinal protection, partially have scientific validity.

Key words : Gardeniae Fructus, processing, poptosis, oxidative stress, gastrointestinal protection

I. 서 론

전통적으로 생약은 건조 후 바로 사용하기도 하지만 수치

(修治)라고 하는 약재 가공 공정을 거친 후 방제(方劑)에 사용되기도 하였다. 이러한 수치 과정은 수천 년에 걸쳐 확립된 경험적 가공법으로 생약의 질과 효능은 높이고 독성은 감하고자

*Corresponding author : Sook Jahr Park, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1298

· Fax : +82-53-819-1406

· E-mail : haany@dhu.ac.kr

#First author : Jong Rok Lee, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1804

· Fax : +82-53-819-1406

· E-mail : jrlee@dhu.ac.kr

· Received : 09 December 2022

· Revised : 03 January 2023

· Accepted : 25 January 2023

하는 것을 목적으로 하고 있다¹⁾. 수치는 포제(炮製), 법제(法製)로도 불리며 물을 사용하여 가공하는 수제(水製), 불을 이용하는 화제(火製), 물과 불을 모두 사용하는 수화합제(水火合製)로 구분된다²⁾. 화제에는 자(炙), 초(炒), 단(煨), 포(炮) 등의 방법이 있으며, 이 과정을 통해 약재의 찬 성질을 약화시키고 독성 및 부작용을 줄일 수 있다^{1,2)}.

치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 잘 익은 열매인 치자는 고한(苦寒)한 성미로 인해 위장을 상하게 할 수 있어 균일한 화력으로 볶는 초(炒)법 또는 액체 보료(輔料)가 스며들게 하여 볶는 자(炙)법으로 수치한 후에 번조(煩躁), 구역(嘔逆)할 때에 사용하였다^{3,4)}. 액체 보료에는 황주(黃酒), 백주(白酒), 미초(米醋), 생강즙(生薑汁), 식염수(食鹽水) 등이 있는데 치자의 수치에는 주로 생강즙이 사용되었다^{1,4)}. 즉, 생강즙을 보료로 하여 볶은 치자는 비위가 약한 사람들에게 위장 장애를 줄여줄 수 있는 수치법이라 할 수 있지만 이를 뒷받침할 과학적 근거는 부족한 상황이다. 치자의 성분화합물에 대한 연구는 다양하게 보고되고 있는데 치자의 주요 성분인 crocin은 crocetin의 배당체로서 항산화, 항염 효과 등이 알려졌다⁵⁾. 또한 genipin, geniposide, gardenoside와 같은 iridoid 화합물과 항염성분인 항염 활성성분인 quinic acid와 vanillic acid 등이 함유되어 있다^{6,7)}. 소화기계에 대한 약리작용으로는 치자 추출물과 성분화합물인 genipin이 제산력(acid-neutralizing capacities)과 항산화 및 *H. pylori*에 대한 항균 활성이 알려졌다⁸⁾, 염산(HCl)으로 위 손상을 유발한 실험동물에서 항위염 효과가 있다고 보고되었다⁸⁾.

환경오염 물질을 포함한 수많은 외인성 요인은 세포 내에서 산화를 촉진시키는 물질을 생성시킬 수 있고⁹⁾, 이러한 환경적 제약과 세포의 항상성을 유지하는 능력 사이에 균형이 깨지면 산화 스트레스 상황이 발생하게 된다¹⁰⁾. 산화 스트레스 자극에 대한 세포의 초기 반응은 세포생존 경로를 활성화하여 스스로를 방어하지만 이 메커니즘이 성공적으로 활성화되지 않으면 세포자멸사(apoptosis), 괴사(necrosis) 및 자가포식(autophagy) 등을 포함하는 세포 죽음이 촉진된다¹¹⁾. 즉, 산화 스트레스는 세포와 조직에 심각한 손상을 일으키고 여러 가지 질병 발생에 영향을 미칠 수 있다. 위 상피세포인 AGS cell에 산화 스트레스를 가하면 세포자멸사에 의한 세포 손상이 유도되었고¹²⁾, *H. pylori* 감염에 의한 위점막 손상도 산화 스트레스 정도에 비례하여 발생하는 것으로 보고되었다¹³⁾.

본 연구에서는 유기 과산화물로서 다양한 세포에서 산화 스트레스를 유발하는 tert-butyl hydroperoxide (tBHP)를 사용하여 위 상피세포의 apoptosis와 산화 스트레스에 대한 수치 치자의 세포 보호 효과를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. *In*

situ cell death detection kit-POD는 Roche (Mannheim, Germany)에서 구입하였고 Rhodamine 123 (Rh123)은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Western blot에 사용한 1차 항체들은 Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 치자 수치(修治) 방법 및 에탄올추출물 준비

수치 치자(processed GF)는 전남생약농협협동조합(전남 화순)에서 구입한 건조 치자에 보료로 생강즙과 주정을 첨가하고 열에 볶는 과정으로 준비하였다. 즉, 건조 치자 8 g을 50 ml conical tube에 각각 담고 치자 질량의 10% (0.8 ml)에 해당하는 주정과 40% (3.2 ml)에 해당되는 부피의 생강즙을 균일하게 도포하여 orbital shaker (Biofree, Seoul, Korea) 위에서 150 rpm, 24시간 동안 처리하였다. 보료를 처리한 치자는 150℃에서 5분 동안 frying pan에서 볶은 후 실온에서 건조하여 최종 2종의 수치 치자를 준비하였다. Frying pan의 온도는 적외선 온도계 (Fluke Co., WA, USA)를 사용하여 150℃로 유지하였다.

에탄올추출물을 준비하기 위해 무수치 치자(unprocessed GF) 및 2종의 수치 치자(processed GF) 각 8 g에 40 ml의 에탄올을 첨가하여 실온에서 72시간 동안 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman, No.2)로 여과하고 60 ± 2℃에서 회전 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축한 후 질소 가스로 건조하였다. 무수치 치자, 생강즙 보료 수치치자 및 주정 보료 수치 치자의 최종 수율은 각각 14.5 ± 0.78%, 14.9 ± 0.24%, 14.9 ± 0.86%였다. 준비된 치자 에탄올추출물(GFE)은 -20℃에서 보관하며 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

AGS cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 10% FBS, 100 units/ml penicillin이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 37℃와 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포는 100 mm의 배양접시에서 80~90% 정도의 confluence에 도달하도록 계대배양 하였고 15 passages를 넘기지 않은 세포만 실험에 이용하였다.

4. MTT assay

세포 생존율은 MTT assay를 통해 조사하였다. AGS cell을 24 well plate에 1 × 10⁵ cells/well로 분주하여 혈청이 포함된 배양배지에서 24시간 배양한 다음 12 시간 동안 혈청 고갈시켰다. 이후 AGS cell에 GFE를 50 µg/ml의 농도로 24시간 처리하고 500 µM tBHP에 3시간 동안 더 노출시켰다. 생존 세포는 0.1 g/ml MTT 용액을 첨가하여 37℃에서 2 시간 반응

시킨 후 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 세포 생존율은 대조세포에 대한 백분율로 다음과 같은 수식에 의해 계산하였다.

$$[\text{Cell viability (\%)} = 100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})].$$

5. TUNEL assay

AGS cell death가 DNA 분절에 의한 apoptosis에 의한 것 인지를 확인하기 위해 TUNEL 염색을 시행하였다. *In situ* cell death detection kit-POD (Roche, Germany)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 TUNEL 염색하였으며, 발색기질로는 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)을 사용하였다.

6. Western blot analysis

처치가 끝난 세포는 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl)를 첨가하여 4°C에서 30 분동안 lysis시켜 whole cell lysate를 준비하였다. BCA protein assay kit로 단백질 정량을 하였고 10%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Gel 상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이하고, 일차 항체 및 이차항체를 반응시켜 준 다음 enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 확인하였다.

7. Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포 내 ROS 측정은 활성산소 및 과산화수소와 반응하여 dichlorofluorescein 형광을 생성하는 DCFH-DA를 이용하였다. 처치가 완료된 세포에 10 μ M DCFH-DA를 30분 동안 염색시키고, 형광 마이크로플레이트 판독기(Biotek Synergy Htx, Winooski, VT, USA)를 사용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm 파장에서 형광강도를 측정하였다.

8. Glutathione (GSH) 함량 측정

처치가 완료된 세포에서 GSH의 함량을 측정하기 위해서 5% metaphosphoric acid를 첨가하여 용해한 후, 원심분리 (3,000 \times g, 4°C, 10 min)하여 단백질을 포함하는 상층액을 얻었다. 상층액은 GSH determination kit (Oxis International Inc, Tampa, FL, USA)를 이용하여 405 nm 파장에서 측정하였다.

9. Mitochondrial Membrane Potential (MMP) 측정

MMP의 변화는 막 투과성 형광 염료인 Rh123을 이용하여 측정하였다. 처치가 완료된 세포에 Rh123 (0.05 mg/ml)을 1 시간 동안 염색하였고, trypsin을 통해 수거된 세포를 1% FBS가 첨가된 PBS에 부유시켜 유세포분석기(BD Accuri C6 Plus, San Jose, CA, USA)로 Rh123 형광 강도의 변화를 측정하였다. 한 샘플 당 20,000개의 세포를 분석하였다.

10. 통계적 검정

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 유의성 검정은 원도우용 SPSS ver. 23 프로그램을 사용하여 one way analysis of variance (ANOVA) 분석을 실시하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

III. 결 과

1. tBHP로 유도된 AGS 세포 독성에 대한 GFE의 보호 효과

위 상피세포주인 AGS cell에서 tBHP가 유도한 세포 독성에 대해 GFE가 보호효과를 발휘하는지 평가하기 위해 무수치 치자와 수치 치자를 처리하여 MTT assay로 확인하였다. 단독으로 처리한 GFE는 실험 농도 (50 μ g/ml)에서 세포 독성을 나타내지 않았으며, tBHP로 인해 감소한 세포 생존율을 회복시키는 효과를 보였다. 수치조건별로 비교해 보면 생강즙을 보료로 처리한 후에 붉은 치자가 유의하게 ($p < 0.05$) 더 효과적인 세포 보호 효과를 나타내었다 (Fig. 1).

2. tBHP로 유도된 세포자멸사에 대한 GFE의 보호 효과

tBHP에 의한 세포 독성이 세포자멸사에 기인하는지 확인하고 GFE가 세포자멸사에 나타내는 효과를 TUNEL assay를 통해 확인하였다. AGS 세포에서 tBHP에 의한 TUNEL-양성 세포(TUNEL-positive cell)의 수가 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하여 세포자멸사에 의한 세포 독성이 유도되었음을 알 수 있었다 (Fig. 2A). GFE는 tBHP에 의한 세포자멸사를 억제하는 효과를 보였으며, 생강즙을 처리하여 준비한 수치 치자에서 가장 적은 수의 TUNEL-양성 세포가 확인되었다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 MTT assay를 통해 세포생존율을 조사한 결과와 일치하는 것으로 생강즙을 보료로 붉은 수치 치자의 우수한 세포 보호 효과를 잘 보여준다.

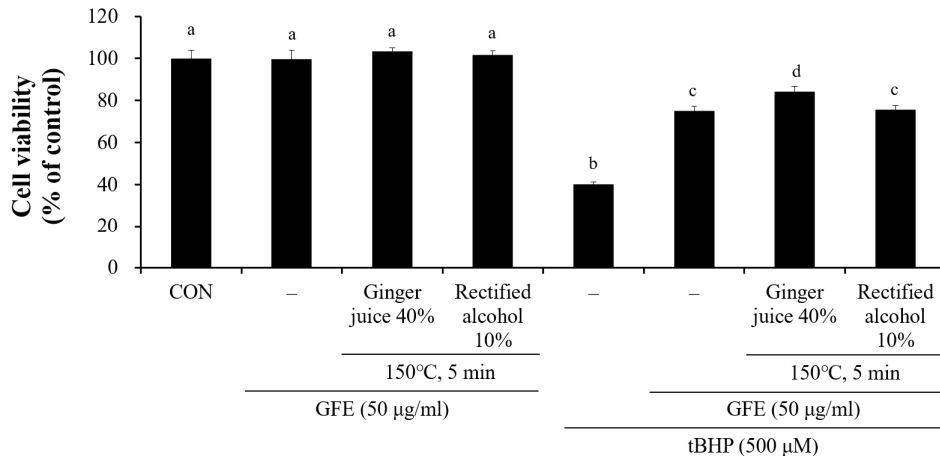


Fig. 1. Effect of GFE on tBHP-induced cytotoxicity in AGS cells
Cells were treated with GFE (50 µg/ml) for 24 h, and then cultured with or without tBHP (500 µM) for 3 h. Cell viability was determined by MTT assay. Values are expressed as the mean ± SD. The different letters (a–d) indicate significant differences (p < 0.05).

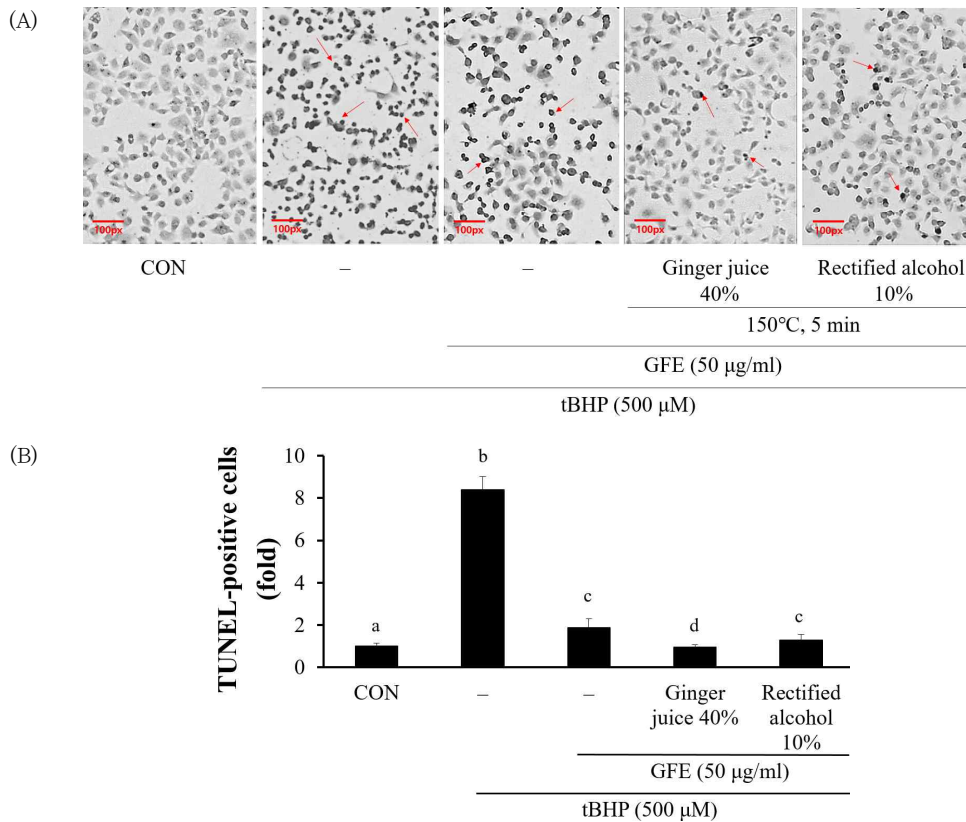


Fig. 2. Effect of GFE on tBHP-induced apoptosis in AGS cells
(A) Apoptotic cells were confirmed by TUNEL staining, and arrows indicate TUNEL-positive cells. (B) The number of TUNEL-positive cells were counted and expressed as a fold value of control. Values are expressed as the mean ± SD. The different letters (a–d) indicate significant differences (p < 0.05).

3. GFE가 세포자멸사 관련 단백질의 발현에 미치는 효과

GFE가 나타내는 항세포자멸사 효과에 관여하는 신호분자들의 단백질 발현을 조사하기 위해 Western blot을 실시하였다. 신호분자들 중에서 procaspase는 세포자멸사에서 중요한

역할을 담당하는 전구 단백질로 절단된 후 활성 caspase로 전환되어 세포자멸사를 유도하게 된다. Bcl-2는 세포자멸사를 억제하는 역할을 하고 Bax와 AIF는 세포자멸사의 진행에 관여

하는 단백질이다¹⁴). tBHP에 의해 procaspase-3와 -9, Bcl-2의 발현은 감소하였으나 GFE에 의해 증가되었다. Bax와 AIF의 발현은 tBHP에 의해 증가하였으나 GFE에 의해 감소되었다 (Fig. 3). 세포자멸사 관련 단백질 발현에 대한 GFE의 조절

효과가 항세포자멸사 활성을 나타내는데 기여하였을 것으로 사료되나 수치 치자와 무수치 치자에 의한 단백질 발현 차이는 확인되지 않았다.

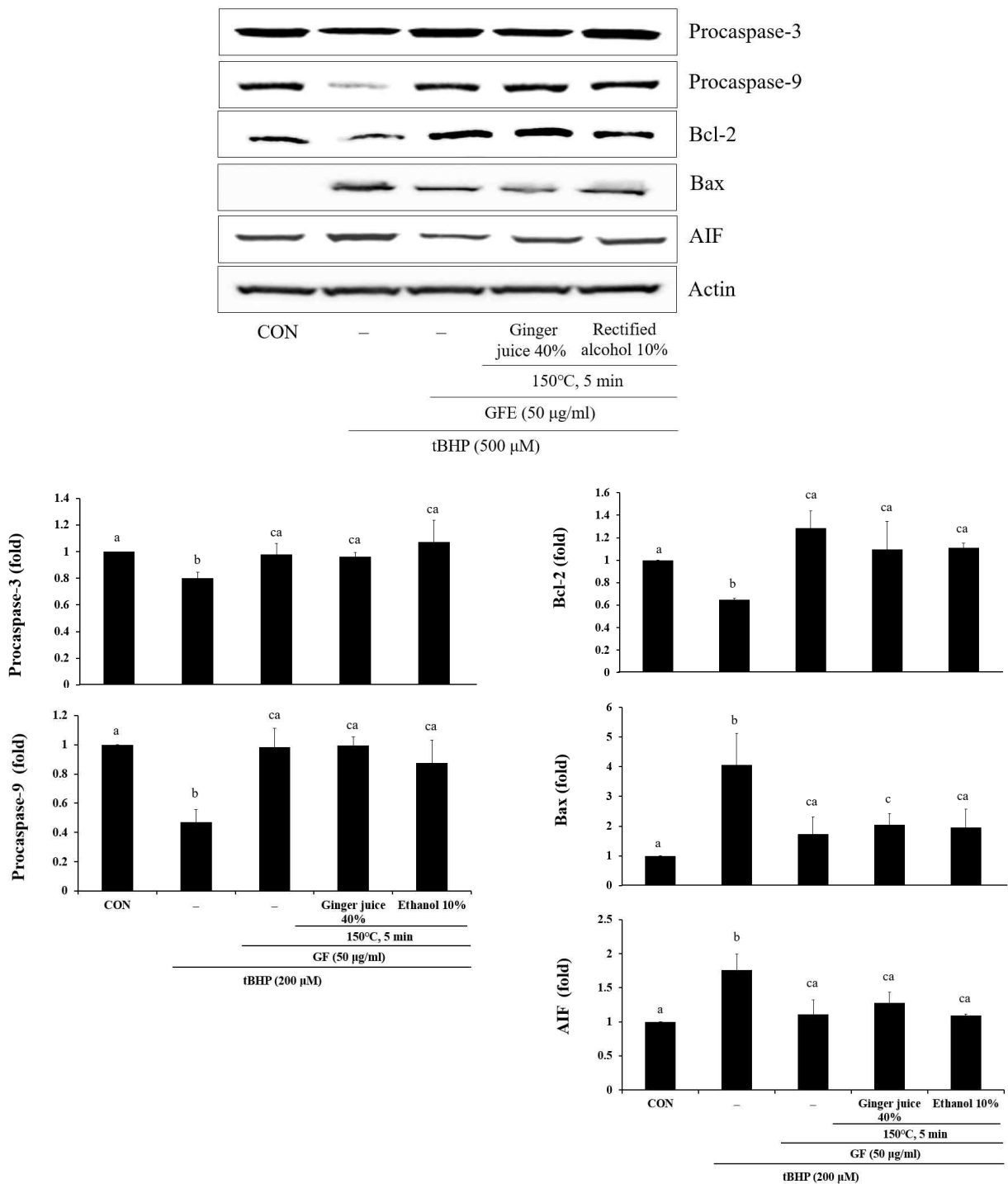


Fig. 3. Effect of GFE on the expression of apoptosis-associated proteins. Cells were treated with GFE (50 µg/ml) for 24 h, and then cultured with or without tBHP (500 µM) for 3 h. The level of expression of the apoptosis marker protein was monitored by Western blot analysis. Actin was used as a loading control. Bar graphs show the band density of Western blot. Data represent the mean ± SD of three separate experiments. The different letters (a-c) indicate significant differences (p < 0.05).

4. GFE가 ROS 과다 생성 및 GSH 감소에 미치는 효과

AGS 세포에서 tBHP에 의해 유도되는 산화 스트레스에 대해 GFE가 어떻게 작용하는지 조사하기 위해 세포 내 ROS와 GSH 함량을 조사하였다. Control과 비교하여 tBHP에 의해 ROS가 $170.7 \pm 7.8\%$ 수준으로 과도하게 생성되었고 GSH는 $78.0 \pm 2.1\%$ 로 감소하였다 (Fig. 4). GFE는 ROS의 생성을 감소시키고 GSH는 증가시킴으로써 항산화활성을 나타내었다. ROS의 경우 수치 치자와 무수치 치자에 의해 유의한 활성 차이가 관찰되지 않았으나 (Fig. 4A), GSH에서는 수치 치자가 무수치 치자에 비해 유의하게 GSH 함량을 증가시켰다. 무수치 치자는 $87.7 \pm 2.2\%$, 생강즙 보료와 주정 보료에 의한 수치 치자는 각각 $97.3 \pm 2.0\%$, $102.0 \pm 1.7\%$ 까지 GSH 수준을 증가시켰으며, 생강즙과 주정 보료 차이에 의한 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4B).

5. GFE가 Mitochondria membrane potential (MMP)에 미치는 효과

산화 스트레스로 세포에 축적된 ROS는 미토콘드리아 투과성을 변화시키고 MMP를 변화시킬 수 있다. 본 연구에서도 tBHP에 의한 ROS 상승과 같이 MMP가 붕괴됨을 확인하였다 (Fig. 5A). MMP가 파괴되어 증가하는 M1 fraction 값을 살펴보면 control에서 $24.5 \pm 2.0\%$, tBHP에서 $81.4 \pm 2.2\%$ 로 나타났다. GFE는 M1 fraction의 증가를 유의하게 ($p < 0.05$) 억제하는 효과를 보였으며 수치 과정에 따른 효과

차이는 유의성이 나타나지 않았다. 무수치 치자, 생강즙 보료 및 주정 보료 수치 치자에서 M1 fraction은 각각 $67.6 \pm 4.8\%$, $66.2 \pm 3.0\%$, $71.5 \pm 2.9\%$ 였다 (Fig. 5B).

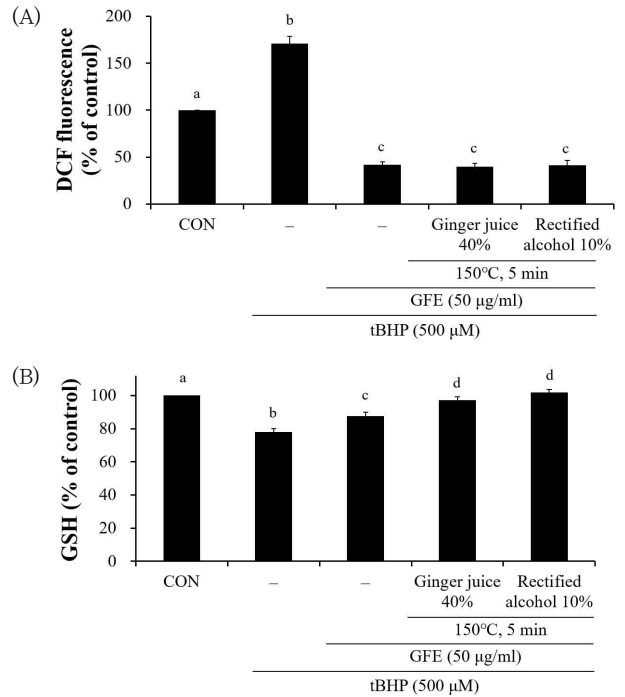


Fig. 4. Effect of GFE on the levels of ROS and GSH (A) ROS level was measured after DCF-DA staining for 15 min and the fluorescence intensity was expressed as percentage of control. (B) GSH contents were measured in cell homogenates as described in material and method section. Values are expressed as the mean \pm SD. The different letters (a-d) indicate significant differences ($p < 0.05$).

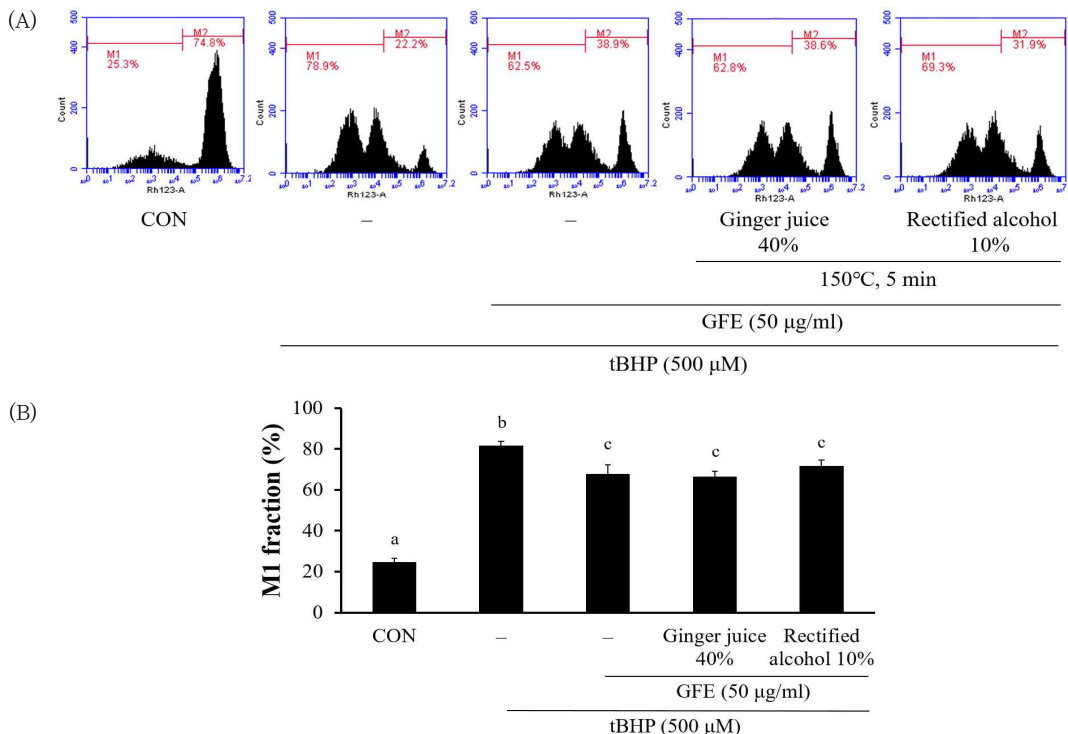


Fig. 5. Effects of GFE on mitochondria membrane potential (MMP) (A) MMP was measured by flow cytometry using Rh123. (B) M1 fraction with low Rh123 fluorescence intensity was counted as an indication of MMP destruction. Values are expressed as the mean \pm SD. The different letters (a-c) indicate significant differences ($p < 0.05$).

6. GFE가 인산화된 MAPK의 발현에 미치는 효과

AGS 세포에서 GFE의 항세포자멸사 및 항산화 효과와 MAPK 신호경로의 연관성을 조사하기 위해 extracellular-signal regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 단백질의 발현을 조사하였다. tBHP에 의해 인산화된 MAPK의 발현이 증가되어 AGS의 산화 스트레스 과정에 MAPK 신호경로가 활성화됨을 알 수 있었다. GFE는 tBHP에

의해 증가된 p-ERK의 발현을 평균적으로 억제하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 또한 GFE는 증가된 p-JNK와 p-p38의 발현을 유의적으로 억제하였으며 무수치 치자와 수치 치자 사이에서 억제효과의 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 6). 이러한 결과는 p-JNK와 p-p38의 인산화 수준의 변화가 GFE의 항산화 및 항세포자멸사 활성을 부분적으로 매개할 수 있다는 것을 의미한다.

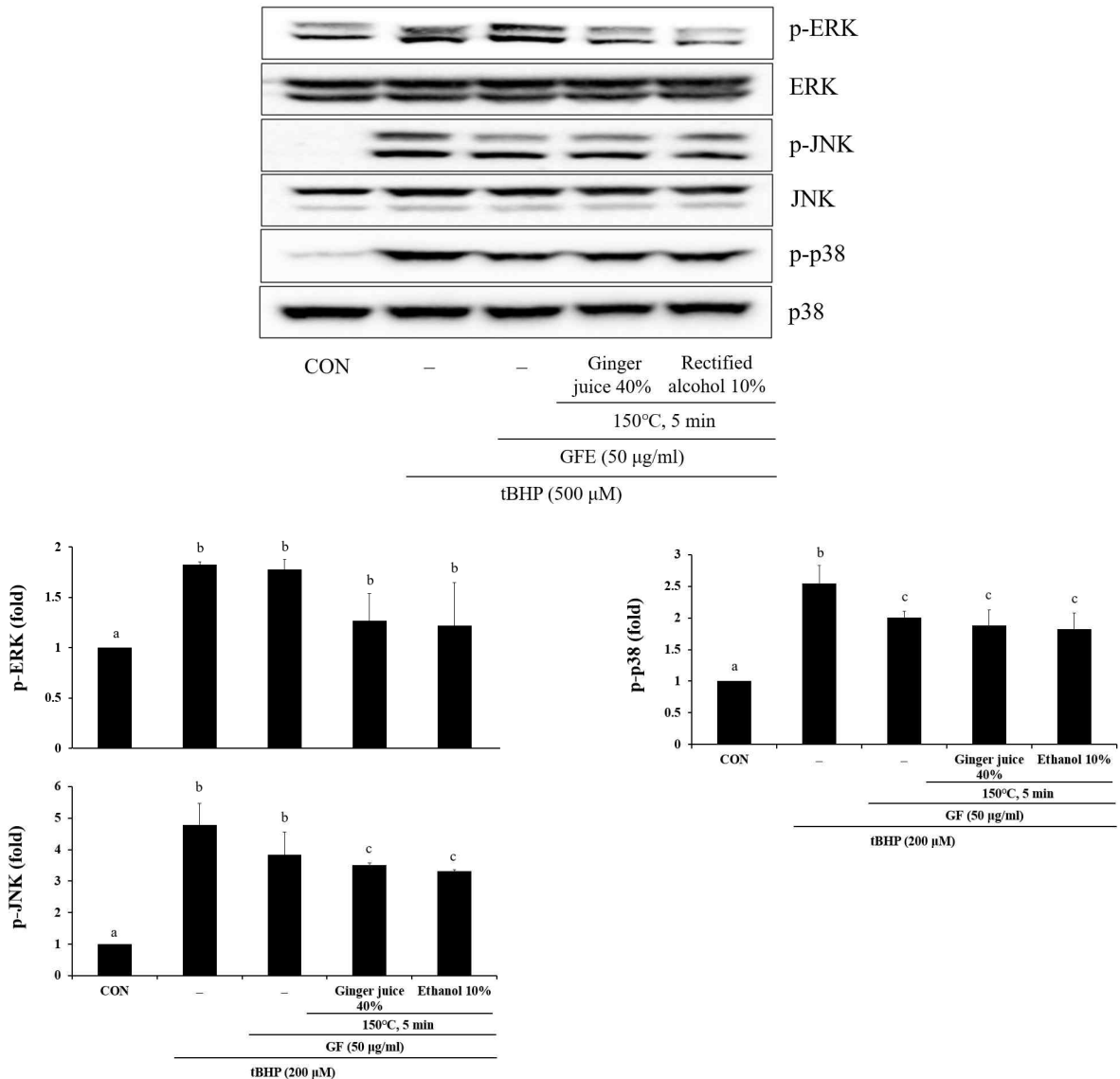


Fig. 6. Effect of GFE on the expression of MAPK protein. Expression of phosphorylated MAPK protein was monitored by Western blot analysis after 24 h incubation of GFE and 30 min exposure of tBHP. Actin was measured as an internal control. Bar graphs show the band density of Western blot. Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. The different letters (a–c) indicate significant differences ($p < 0.05$).

IV. 고 찰

한의학에서 비위가 약한 사람에게 치자를 처방할 때는 생강즙을 보료로 하여 볶은 수치 치자를 사용하여 위장장애를

줄이고자 하였다^{3,4}. 본 연구에서는 생강즙과 주정을 보료로 하여 볶은 수치 치자가 산화 스트레스가 유발된 위 상피세포에서 어떤 효과를 나타내는지 살펴보았다. 위 상피세포에서 산화 스트레스에 의한 급성 세포손상은 막 지질의 과산화를

일으키는 tBHP를 사용하여 유도하였다. tBHP는 현저한 세포 사멸을 이끌었으며 TUNEL 염색을 통해 세포사멸사를 통한 세포 생존을 저하를 유도함을 확인하였다. 수치 치자는 이러한 세포사멸을 억제하였는데 특히 무수치 치자와 비교하여 생강즙을 보료로 사용하여 볶은 수치 치자가 우수한 세포생존을 회복 및 항세포사멸사 효과를 나타내었다.

세포사멸사 과정에는 ROS의 증가가 종종 관찰되고 ROS의 비정상적인 생성은 세포사멸사의 지표이다^{15,16}. 호흡의 전자 전달과정에서 전자흐름이 원활하지 않을 경우 누출된 전자가 산소에 전달되어 ROS의 생성이 증가하지만 세포내 항산화 시스템이 정상작동하면 ROS 수준을 정상적으로 되돌릴 수 있다. ROS의 과다 생성이 조절되지 못하면 지질, 단백질, DNA에 대한 산화적 손상이 일어나게 된다. 본 연구에서 tBHP에 의해 ROS가 증가하였으나 치자 추출물에 의해 감소됨을 확인하였다. 세포내 항산화 시스템은 catalase, super oxide dismutase 와 같은 항산화 효소와 GSH와 같은 비효소적 항산화물질로 구성 되는데 산화 스트레스 상황에서 GSH는 과산화물, ROS, free radical을 제거함으로써 기능을 발휘한다. tBHP는 세포 GSH를 고갈시키는 것으로 알려져 있으며¹⁷, 본 연구에서도 ROS 수준의 과도한 증가에서 나타난 바와 같이 tBHP에 의해 GSH 수준이 현저하게 감소되었다. 하지만 치자 추출물은 고갈된 GSH 수준을 회복시켰으며 무수치 치자에 비해 생강즙 보료의 볶은 수치 치자가 더 나은 효과를 보였다. 이는 tBHP로 인한 세포 손상에서 생강즙 보료의 볶은 수치 치자가 탁월한 항세포사멸사 효과를 나타낸 것과 일치하며, 증가된 세포 산화 스트레스에서 생강즙 보료의 볶은 수치 치자가 가장 우수한 세포 보호 작용을 발휘함을 시사한다. LPS로 염증을 유발한 마우스 대식세포에서도 생강즙 보료의 볶은 수치 치자가 가장 우수한 항염 활성을 보였다¹⁸. 무수치 치자와 비교하여 생강즙 보료의 볶은 수치 치자는 LPS에 의해 과다 발현된 iNOS와 COX-2를 억제하고 IL-1 β 와 IL-6와 같은 proinflammatory cytokine의 생산을 유의하게 저해하였다.

미토콘드리아는 세포 사멸 경로를 조절하는 데 중요한 역할을 하는 세포 소기관으로 미토콘드리아의 산화 손상은 노화 및 많은 질병과 관련이 있다¹⁹. 항산화 시스템의 균형이 깨진 상황에서 미토콘드리아의 전자전달 과정에서 과도하게 생성된 ROS는 미토콘드리아 막전위(MMP)의 변화를 초래하고 미토콘드리아 막 손상에 의한 세포사멸을 유발한다²⁰. tBHP에 의한 MMP의 변화는 본 연구에서도 확인이 되었으며 치자는 MMP 손상을 억제하는 효과를 보였다. 따라서 수치 치자는 세포 GSH 수준을 증가시키고 ROS 생성을 감소시켜 산화 스트레스를 억제함으로써 MMP를 유지하고 항세포사멸사 효과를 나타낸다고 할 수 있다. 세포사멸 신호가 유도될 때 Bcl-2 계열 단백질은 주요 조절인자로 작용하는데 proapoptotic Bcl-2와 antiapoptotic Bcl-2 사이의 균형이 깨지면 세포사멸사에 관여하는 단백질 분해효소인 caspase-9 및 하위 caspase-3가 활성화된다²¹⁻²³. 본 연구에서는 tBHP에 의해 proapoptotic protein인 Bax의 발현은 증가되고 antiapoptotic protein인 Bcl-2의 발현은 감소되었다. 수치 치자는 이러한 단백질들의 발현 변화를 control 수준에 가깝게 회복시켜 항세포사멸사 효과를 나타내었다. Procaspase는 절단되어 활성형의 caspase가 되는데 본 실험에서는 tBHP가 procaspase-9, -3의 발현

감소를 유도하여 caspase의 활성화에 의한 세포사멸사를 유도함을 확인할 수 있었다. tBHP에 의한 감소된 procaspase의 발현은 GFE에 의해 회복되어 GFE가 caspase의 활성화를 억제함을 알 수 있었다. 이런 결과는 procaspase의 발현 변화를 통해 caspase의 활성을 간접적으로 살펴 본 결과임으로 GFE가 cleaved caspase의 발현 양상에 미치는 영향을 더 살펴볼 필요가 있다.

MAPK는 잘 확립된 세포 신호전달 매개체로서 세포의 성장과 분화 및 사멸 조절에 주요한 역할을 담당하고 있으며 extracellular-signal regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38의 subfamily로 구성되어 있다^{24,25}. ERK는 세포 성장인자의 신호전달에 주로 관여하며 세포의 증식 및 분화에 중추적인 역할을 담당한다. 반면에 stress kinase로 분류되는 JNK와 p38은 산화적 스트레스 또는 TNF와 같은 cytokine 등에 반응하여 세포 사멸에 관여한다²⁶. 외부적으로 tBHP를 처리하게 되면 MAPK가 인산화된다는 것이 알려져 있다. 심근세포인 H9C2에서 tBHP에 의해 MAPK의 인산화가 유도되었으며²⁷, 내피세포인 HUVEC에서는 p38 inhibitor가 tBHP에 의한 세포 독성을 감소시키고 caspase 활성화에 억제효과를 보여 tBHP로 유도된 세포 사멸에서 주요한 역할을 하는 것으로 확인되었다²⁸. 본 연구에서 사용한 위 상피세포에서도 tBHP에 의해 MAPK의 인산화가 유도되었다. 하지만 수치 치자에 의해 p-JNK와 p-p38의 발현이 억제되었으며 이는 산화 스트레스로 인한 세포 손상에서 나타나는 수치 치자의 세포 보호 작용에서 부분적으로 MAPK 신호 억제가 관여함을 의미한다.

이상의 결과들로부터 tBHP에 의해 유도된 산화 스트레스 매개 세포 사멸에 대한 수치 치자의 세포 보호 효과를 확인하였다. 수치 치자는 항세포사멸사 및 항산화 활성을 통하여 유의한 위 상피세포 보호 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 한 의학에서 비위가 약한 사람들에게 수치 치자를 처방하였던 것에 대한 과학적인 근거를 부분적으로 제시한다고 할 수 있다.

V. 결 론

본 연구에서는 tBHP로 산화 스트레스를 유발하여 세포 독성이 증가된 위 상피세포에서 생강즙과 주정을 보료로 하여 볶은 수치 치자의 세포 보호 효과를 확인하고자 하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 수치 치자는 위 상피세포 독성에 의한 세포 생존을 감소를 유의하게 억제하였으며 tBHP로 유도된 세포 사멸에 대하여 유의한 항세포사멸사 효과를 보였다. 수치 치자의 항세포사멸사 효과는 caspase와 Bcl-2 및 Bax 단백질의 발현을 조절함으로써 나타났다.
2. 수치 치자는 tBHP에 의해 과도하게 생성된 ROS 수준을 감소시켰고 고갈된 GSH의 수준은 증가시킴으로써 항산화 효과를 나타내었다.

3. 수치 치자는 산화 스트레스로 손상된 MMP의 변화를 회복시켰으며 tBHP에 의해 증가된 p-JNK와 p-p38 MAPK의 발현을 억제하였다.

따라서 수치 치자는 tBHP에 의한 산화 스트레스로 유도된 위 상피세포의 MAPK 인산화와 MMP의 손상을 억제함으로써 항산화 및 항세포자멸사 효과를 나타내고 세포 보호 활성을 가짐을 알 수 있다.

Acknowledgment

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MOE) (No. 2017R1D1A3B03031863).

References

- Kim TY, Kim DU, Kang Y. New insight of the needs for standardization on the processing of herbal medicines: Concentrated on standard terminology. *Korean Herb Med Inf.* 2019 ; 7(1) : 41–69.
- Kim IR. Studies about the origin, storage, cutting, processing and decocting methods of medicinal herbs. Seoul : Korea Institute of Oriental Medicine. 1998 : 1–3.
- Kim IR. A research on the origin and daily dose of Gardeniae Fructus in Shanghanlun. *Kor J Herbol.* 2011 ; 26(4) : 155–61.
- Shin YW, Kim DH, Kim NJ. Studies on the processing of crude drugs(7) – On the constituents and biological activities of Gardeniae Fructus by processing. *Kor J Pharmacogn.* 2003 ; 34(1) : 45–54.
- Alavizadeh SH, Hosseinzadeh H. Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review. *Food Chem Toxicol.* 2014 ; 64 : 65–80.
- Xiao W, Li S, Wang S, Ho CT. Chemistry and bioactivity of Gardenia jasminoides. *J Food Drug Anal.* 2017 ; 25(1) : 43–61.
- Kim KH, Kim SM, Shin SH, Lee YJ, Baek WS. Quality monitoring of specification standard of Gardeniae Fructus in the Korean pharmacopoeia and studies HPLC standard chromatogram. *Kor J Herbol.* 2017 ; 32(2) : 97–105.
- Lee JH, Lee DU, Jeong CS. Gardenia jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food Chem Toxicol.* 2009 ; 47(6) : 1127–31.
- Mahajan L, Verma PK, Raina R, Pankaj NK, Sood S, Singh M. Alteration in thiols homeostasis, protein and lipid peroxidation in renal tissue following subacute oral exposure of imidacloprid and arsenic in Wistar rats. *Toxicol Rep.* 2018 ; 5 : 1114–9.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem.* 2004 ; 11(9) : 1163–82.
- Fulda S, Gorman A, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *Int J Cell Biol.* 2010 ; 2010 : 214074.
- Han L, Xia X, Xiang X, Huang F, Zhang Z. Protective effects of canolol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in AGS cells. *RSC Adv.* 2017 ; 7 : 42826–32.
- Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Sheaff MT, Banatvala N, Laurenson IF, Blake DR, Rampton DS. Helicobacter pylori stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut.* 1994 ; 35 : 179–85.
- Hussar P. Apoptosis regulators Bcl-2 and caspase-3. *Encyclopedia.* 2022 ; 2 : 1624–36.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000 ; 32 : 157–70.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000 ; 5 : 415–8.
- Crane D, Häussinger D, Graf P, Sies H. Decreased flux through pyruvate dehydrogenase by thiol oxidation during t-butyl hydroperoxide metabolism in perfused rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1983 ; 364(8) : 977–87.
- An I, Kim SC, Byun SH, Lee JR, Park SJ. Anti-inflammatory effect of the processed Gardeniae Fructus in LPS-induced macrophages. *Herb Formula Sci.* 2019 ; 27(4) : 245–55.
- Selvakumar GP, Manivasagam T, Rekha KR, Jayaraj RL, Elangovan N. Escin, a novel triterpene, mitigates chronic MPTP/p-induced dopaminergic toxicity by attenuating mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis. *J Mol Neurosci.* 2015 ; 55 : 184–97.
- Imberti R, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 ; 265(1) : 392–400.
- Marsden VS, Ekert PG, Delft MV, Vaux DL, Adams

- JM, Strasser A. Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol.* 2004 ; 65(6) : 775-80.
22. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 2009 ; 122 : 437-41.
23. Noh GP, Byun SH, Lee JR, Park SJ, Kim SC. Protective effect of Citrus unshiu peel on the cadmium-induced apoptosis in HepG2 cells. *Kor J Herbol.* 2021 ; 36(1) : 41-9.
24. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010 ; 48(6) : 749-62.
25. Lee JY, Yu BP, Chung HY. Activation mechanisms of endothelial NF-kappa B, IKK, and MAP kinase by tert-butyl hydroperoxide. *Free Radic Res.* 2005 ; 39(4) : 399-409.
26. Pober JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annu Rev Pathol.* 2009 ; 4 : 71-95.
27. Wu YT, Xie LP, Hua Y, Xu HL, Chen GH, Han X, Tan ZB, Fan HJ, Chen HM, Li J, Liu B, Zhou YC. Tanshinone I inhibits oxidative stress-induced cardiomyocyte injury by modulating Nrf2 signaling. *Front Pharmacol.* 2021 ; 12 : 644116.
28. Zhao W, Feng H, Sun W, Liu K, Lu JJ, Chen X. Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells: Roles of NOX4 and mitochondrion. *Redox Biol.* 2017 ; 11 : 524-34.